

エゾアワビ人工種苗の放流効果に関する遺伝学的解析

| | |
|--------|---|
| 著者 | 早坂 瞬 |
| 号 | 49 |
| 学位授与機関 | Tohoku University |
| 学位授与番号 | 農博第1048号 |
| URL | http://hdl.handle.net/10097/60262 |

氏名（本籍地） 早坂 瞬
学位の種類 博士（農学）
学位記番号 農博第1048号
学位授与年月日 平成25年3月27日
学位授与の要件 学位規則第4条第1項
研究科，専攻 東北大学大学院（博士課程）農学研究科資源生物科学専攻
論文題目 エゾアワビ人工種苗の放流効果に関する遺伝学的解析
博士論文審査委員 （主査）教授 木島 明博
教授 吾妻 行雄
准教授 陶山 佳久
准教授 池田 実

論文内容要旨

序論

日本、韓国、中国において食品および漢方薬の素材として重要なエゾアワビ (*Haliotis discus hannai*) は、沿岸岩礁域の比較的浅い水深域に生息するために漁獲されやすく、適切な資源管理が必要不可欠な種である。その一環として、日本では 20 世紀後半に人工種苗生産技術が開発され、天然海域の生産性を活用した人工種苗の放流と採捕が各地で盛んに行われてきた。しかし、その効果に関しては地域、年度による違いがあり、その要因に関する科学的知見は少ない。特に、その要因の分析の基盤となる人工種苗における親個体の寄与、放流個体の生存性に関する知見はきわめて少ないのが現状である。

エゾアワビの放流効果は、これまで人工種苗で現れるグリーンマークを指標として査定されてきた。しかし、グリーンマークは餌による殻色の変化であるため、人工種苗個体が生産された地域、使われた親の由来、生存個体（採捕された個体）の親の組み合わせなどを明らかにすることはできない。また、世界的な課題となっている遺伝的多様性の確保に関しても情報を得ることはできない。この点、近年技術的発展が目覚ましい DNA 分析を利用する方法が考えられる。

本研究は、岩手県水産技術センターが海域を設定し、実施した人工種苗生産から放流、採捕までの一貫した実験において得られたエゾアワビを対象に、マイクロサテライト DNA マーカーを用いて、アリル頻度に基づいた放流効果の推定を行うとともに、作出した放流種苗および放流採捕個体の個体識別（親子判別）分析から個体レベルでの放流効果の推定を行った。また、親子判別分析の結果を用いて、人工種苗段階における親個体の寄与、ならびに放流採捕個体における親個体の寄与について個体レベルで明らかにし、DNA マーカーを用いた人工種苗生産・放流によるエゾアワビの資源管理法について総合的に考察することを目的とした（図 1）。

第 1 章 解析に用いるマイクロサテライト (ms) DNA マーカーの選定

エゾアワビにおいて既に開発されているマイクロサテライト DNA マーカー（以下、msDNA と記す）から、集団解析に適した msDNA 座を選択するため、放流実験の場となった岩手県大船渡市飛磯地区（図 2）から採集した野生 52 個体を対象に、連鎖地図、繰り返し配列の単純さ、アニーリング温度をもとに 24msDNA 座を選択し、アリル表現型組成を求めた。その結果をもとに、ハー

ディ・ワインベルグ平衡からの有意な逸脱の有無、ヌルアリの存在の有無、および異なる 2 個体が同一の遺伝子型を持つ確率を表す指標である PID (Probability of Identity) の高低によってマーカーとしての有用性を判定したところ、13msDNA 座が集団解析に適していることがわかった。なお、人工種苗と親個体の対応関係によって親の遺伝子型を明らかにできれば、24msDNA 座が親子判別分析の際にマーカーとして使用できると考えられた (図 3)。

第 2 章 アリ頻度に基づいた放流効果の推定

第 1 章で選択した 13msDNA 座を用いて、アリ頻度の変化量に基づいた放流効果の推定を行うため、放流前天然集団 52 個体、作出した放流種苗からランダムに抽出した 140 個体、2006 年に採捕した成員 71 個体、2007 年に採捕した成員 79 個体、2009 年に採捕した成員 91 個体 (図 1) を対象にアリ頻度を調べた。また、その結果をもとに図 4 に示した式を用いて、天然集団に対する放流種苗の混合率 (放流効果) を推定したところ、2006 年では 34.2%、2007 年では 34.1%と推定され、グリーンマークから推定した値よりも大きくなった。一方、グリーンマーク個体がみられず全てが野生個体と考えられた 2009 年において推定した混合率は 20.4%となった。このことから、グリーンマークの標識としての有効性の問題、およびアリ頻度変化量に基づいた推定方法の正確性の問題が提起され、その解決のために確実な親子関係の把握による詳細な放流効果を求める必要があると考えられた。

第 3 章 親子判別分析に基づいた放流効果の推定

第 2 章において、正確な放流効果を求めるためには確実な親子関係の把握に基づいて推定を行う必要性が指摘された。そのためには遺伝標識による親子判別分析が必要不可欠となる。本章は、第 1 章で調べた 24msDNA 座を用いて、生産された人工種苗とその親個体におけるアリ表現型の分布から親個体の正確な遺伝子型を確定するとともに、全ての人工種苗に対して 1 組の親の組み合わせが特定できることを検証したうえで、放流後の天然海域から採捕した成員の中から放流種苗を特定し、混獲率を求めることにより放流効果を推定することを目的とした。

人工種苗と親個体の 24msDNA 座におけるアリ表現型を用いて、親子判別ソフト PARFEX による分析を行った結果、11msDNA 座においてヌルアリの

存在が推定でき、親の遺伝子型を確定することができた（表 1）。また、その遺伝子型をもとに人工種苗の両親を推定したところ、全ての放流種苗個体において人工種苗生産に用いた親個体の組み合わせを矛盾無くそれぞれ 1 組ずつ特定することができた。そこで、24msDNA 座を用いて放流後の 2006 年、2007 年、2009 年に採捕した成員のアリル表現型を明らかにし、上記で確定した種苗生産に用いた親個体の遺伝子型と比較した。その結果、2006 年に採捕した 71 個体のうちグリーンマークを有する 21 個体中 16 個体でそれぞれ 1 組の両親を特定することができ、本実験の人工種苗と判別され、推定された放流効果（混獲率）は 22.5%となった（表 2）。また、グリーンマークを持っていながら親の特定ができなかった 5 個体は、複数の座において種苗生産に用いた親個体にないアリルを示し、他地域に放流された由来の異なる人工種苗であると考えられた。同様に、2007 年に採捕した 79 個体のうち、グリーンマークを有する 21 個体中 16 個体が本実験における人工種苗と判別ができ、20.3%の放流効果が推定できた（表 2）。また、本実験の人工種苗と由来の異なる人工種苗と考えられる 5 個体が採捕された。グリーンマークを有する個体が存在しない 2009 年に採捕した 91 個体では全ての個体で親の特定ができず、本実験の人工種苗はみられなかった（表 2）。

以上の結果から、msDNA 座を標識とすることによって人工種苗放流後の追跡調査が確実に可能であり、本実験で放流した人工種苗は放流後 3 年間（5 歳貝）までは放流海域に生息することがわかった。

一方、本実験の人工種苗以外の人工種苗が、これまで放流実績のない本実験海域で採捕されたことから、本実験の人工種苗も他の海域に移動している可能性が考えられた。そこで、2007 年に飛磯地区から 3km ほどの距離にある門之浜地区（図 2）から採捕した成貝 78 個体（図 1）を対象に同様の解析を行った。その結果、門之浜地区においては本実験の人工種苗と特定できた個体が 11 個体みられ、飛磯地区から門之浜地区（図 2）への移動が示された。このことから、エゾアワビ人工種苗の移動距離はこれまで考えられてきた距離（約 1km）よりも大きいことが明確になり、より広い範囲で msDNA 座による調査を行うことで人工種苗の拡散および広範囲での放流効果の査定が可能となることを示した。

第 4 章 放流種苗および放流後天然集団における親の寄与率

第 3 章の結果から、msDNA 座を標識とすることによって生産した人工種苗

の親個体を特定できることがわかった。本章は、前章で用いた msDNA 座を用いて、放流前の人工種苗個体、ならびに放流後に採捕された人工種苗個体における親個体の寄与について明らかにし、人工種苗生産・放流・採捕における遺伝的課題について考察することを目的とした。

人工種苗生産を行った 6 月と 9 月の人工種苗個体について msDNA 遺伝子型から親子判別分析を行った結果、6 月生産の種苗においては F002×M001、9 月生産の種苗においては F005×M001 と F005×M004 の組み合わせで有意に多くの個体がみられ、種苗生産段階で特定の親の組み合わせが子どもの生残に寄与していることがみられた（図 5）。一方、放流後に採捕された人工種苗個体に寄与した親個体を特定した結果、図 5 に示すように、放流時に多かった親の組み合わせの子どもはほとんど観察されることがなく、放流時点では少数だった親の組み合わせの個体が多くみられた。これらの個体に寄与した雄親の視点から見ると、結果的に M004 の個体の子供のみがみられた。同様の結果は、2006 年と 2007 年の飛磯地区、2007 年の飛磯地区と門之浜地区という 2 年間 2 地域にわたって共通してみられた。

以上の結果から、生産された人工種苗に寄与する親個体は均等に寄与するのではなく、生産時において偏ること、放流以降は生産された人工種苗の親の偏りのまま生残するのではなく、異なる親から生産された人工種苗が多く残ることがみられ、遺伝的多様性の維持を考慮した健全な人工種苗の効率的な生産に重要な課題を与える結果となった。

総合考察

本研究の結果から、従来のアليل頻度、あるいはグリーンマークのみを指標として放流効果を推定する方法では精密な解析はできなかったが、多くの msDNA 座を用いた親子判別分析を行うことで詳細な放流効果の査定が可能であることを示した。また、人工種苗に寄与した親個体の偏りや、放流採捕個体に寄与した親の偏りを明らかにすることができ、これまで不明確であったエゾアワビの人工種苗生産・放流・採捕に関して多くの課題を明確に示すことができた。特に、放流された人工種苗の移動距離がより広範囲であったことから、調査範囲の拡大の必要性が示された。また、人工種苗に寄与した親個体の偏りや、放流後に採捕された人工種苗に寄与した親個体が放流時と異なっていたこと、さらに最終的にはきわめて少数の親個体の寄与であったことは、これまで

の人工種苗生産・放流の方法、およびその追跡調査方法を再考する必要があることを示した。

しかし、本研究は1地域、1回のみの人工種苗生産・放流・採捕におけるデータであることから、今後、1つの地域が生産した人工種苗全体を対象に、生産に関わった親個体の全数、生産した人工種苗の定期的なサンプリング（各交配区における幼生、着底直後の稚貝、着底後1ヶ月、3ヶ月、6ヶ月、1年、放流直前）を行うとともに、放流を行っている複数の地域で少なくとも3年以上の期間にわたって毎年放流採捕を行ってグリーンマーク個体を収集し、それら全てを対象にmsDNA分析を行うことによってデータが得ることができれば、本論文で提起した課題を解決に導くことが可能となり、人工種苗生産・放流・採捕によるエゾアワビの資源管理方法が確立できるものと期待する。

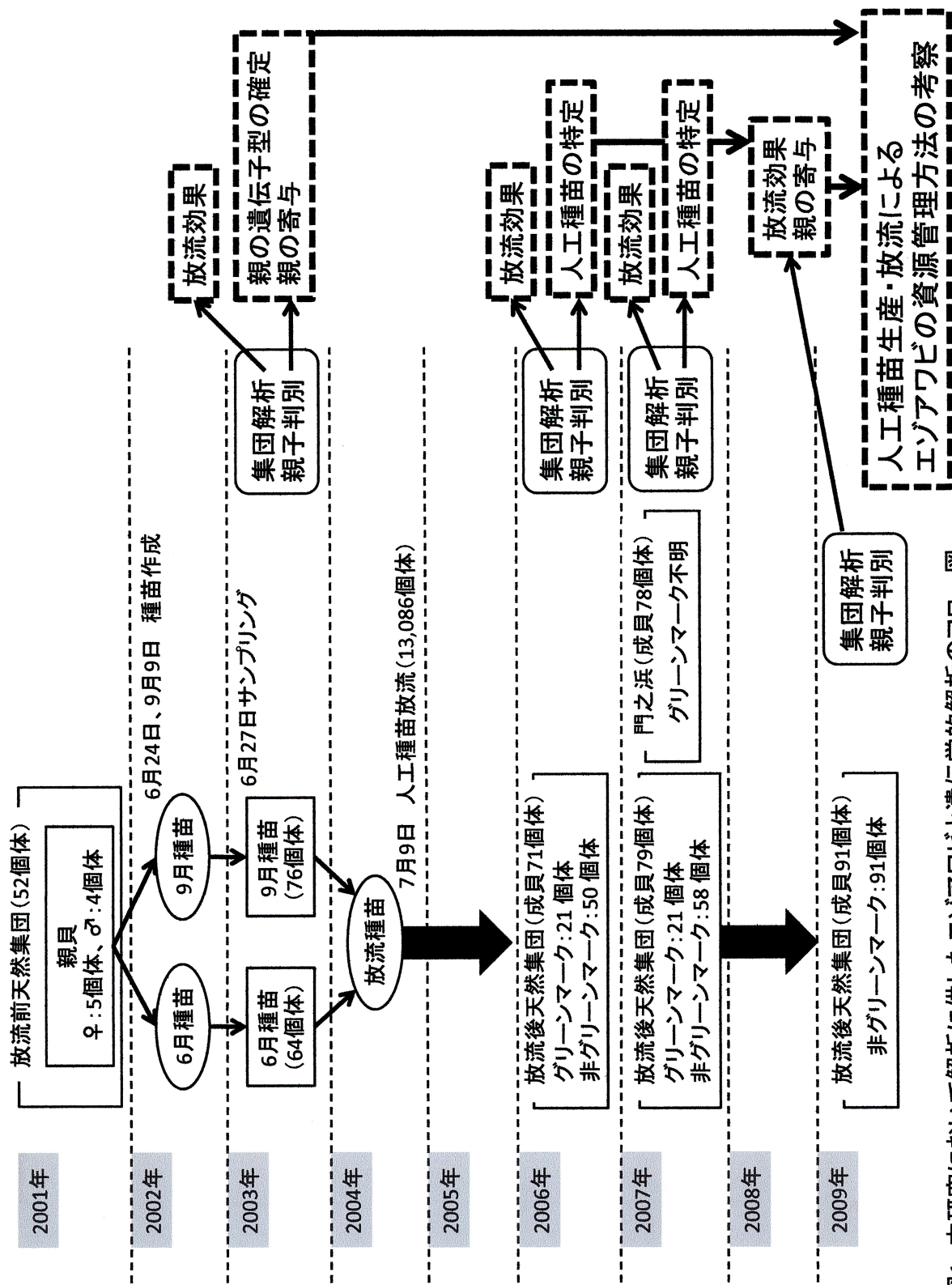


図1. 本研究において解析に供したエゾアワビと遺伝学的解析のフロー図



図2.本研究で用いた放流実験海域
およびサンプル採集地点

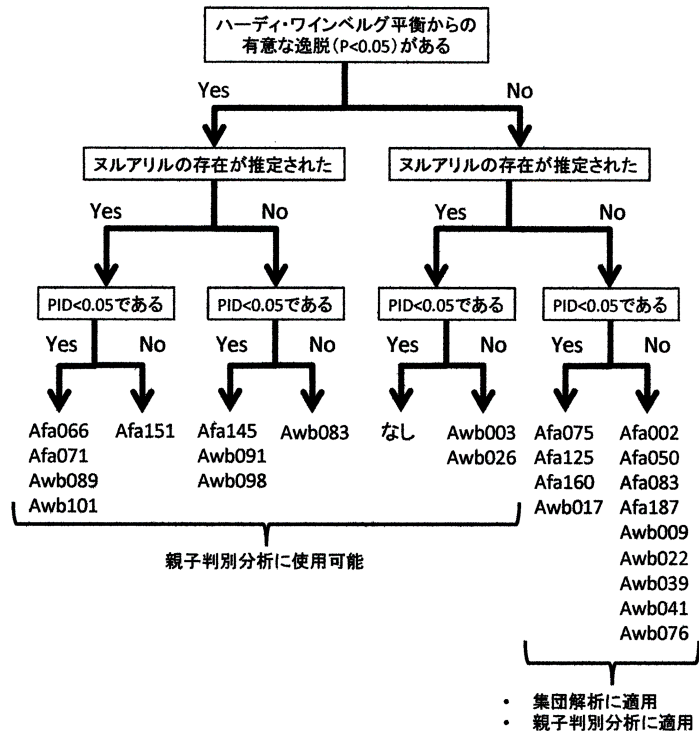


図3. 各msDNA座の解析への適性の判別

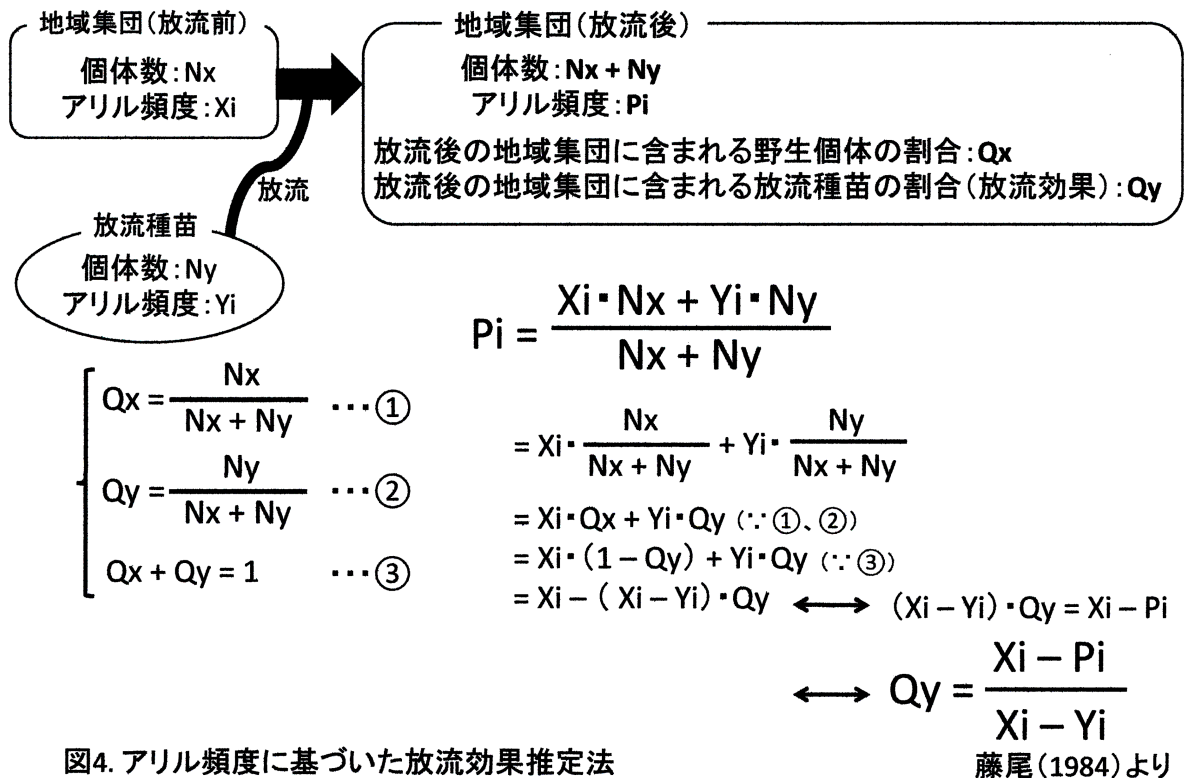


図4. アレル頻度に基づいた放流効果推定法

表1. 種苗生産に用いた親貝における
24msDNA座のアリル型(遺伝子型)

| | | MS座 | | | | | |
|------|------|---------|----------|-----------|-----------|----------|---------|
| 個体番号 | | Afa002 | Afa050 | Afa086 | Afa071 | Afa075 | Afa083 |
| ♀ | F001 | 157 176 | 222 223 | 220 245 | 195 null | 150 212 | 212 220 |
| | F002 | 170 176 | 220 221 | 249 258 | 201 null | 150 170 | 220 220 |
| | F003 | 157 172 | 223 223 | 215 243 | null null | 155 159 | 205 220 |
| | F004 | 168 170 | 220 223 | 247 null | 198 206 | 166 195 | 205 212 |
| | F005 | 170 174 | 220 223 | 198 260 | 193 null | 150 150 | 220 243 |
| ♂ | M001 | 168 170 | 222 226 | 235 258 | 210 null | 159 null | 212 212 |
| | M002 | 168 172 | 220 223 | 224 233 | 208 null | 180 180 | 212 212 |
| | M003 | 172 174 | 222 222 | null null | 206 null | 155 180 | 212 212 |
| | M004 | 168 172 | 220 null | 241 256 | 203 null | 155 180 | 205 212 |

| | | MS座 | | | | | |
|------|------|---------|----------|----------|---------|---------|---------|
| 個体番号 | | Afa125 | Afa145 | Afa151 | Afa160 | Afa187 | Awb003 |
| ♀ | F001 | 178 198 | 184 188 | 273 273 | 217 217 | 237 237 | 266 266 |
| | F002 | 195 198 | 181 188 | 273 null | 234 248 | 237 237 | 290 299 |
| | F003 | 195 198 | 188 188 | 273 273 | 217 248 | 237 237 | 274 290 |
| | F004 | 182 198 | 183 null | 273 273 | 204 219 | 237 237 | 266 274 |
| | F005 | 198 199 | 175 188 | 273 null | 208 268 | 237 237 | 266 266 |
| ♂ | M001 | 191 201 | 190 null | 273 null | 217 267 | 231 237 | 266 274 |
| | M002 | 198 201 | 175 null | 273 null | 217 244 | 237 237 | 270 294 |
| | M003 | 184 199 | 184 null | 273 null | 209 242 | 231 235 | 266 278 |
| | M004 | 201 203 | 188 188 | 273 273 | 217 217 | 231 235 | 266 266 |

| | | MS座 | | | | | |
|------|------|---------|---------|---------|----------|---------|---------|
| 個体番号 | | Awb009 | Awb017 | Awb022 | Awb026 | Awb039 | Awb041 |
| ♀ | F001 | 241 246 | 213 217 | 210 210 | 163 175 | 186 188 | 208 208 |
| | F002 | 244 254 | 215 221 | 208 210 | 171 175 | 184 192 | 208 226 |
| | F003 | 241 241 | 213 217 | 210 210 | 163 171 | 184 186 | 208 208 |
| | F004 | 241 250 | 213 219 | 210 210 | 163 163 | 184 184 | 214 223 |
| | F005 | 241 241 | 217 223 | 210 210 | 163 171 | 184 192 | 208 208 |
| ♂ | M001 | 241 241 | 217 221 | 210 210 | 171 175 | 184 184 | 208 220 |
| | M002 | 241 246 | 213 217 | 210 210 | 171 178 | 184 188 | 208 232 |
| | M003 | 241 254 | 213 215 | 210 210 | 163 null | 184 188 | 208 220 |
| | M004 | 241 241 | 217 221 | 208 210 | 175 null | 184 184 | 208 208 |

| | | MS座 | | | | | |
|------|------|---------|----------|----------|----------|---------|----------|
| 個体番号 | | Awb076 | Awb083 | Awb089 | Awb091 | Awb098 | Awb101 |
| ♀ | F001 | 189 204 | 240 240 | 206 210 | 221 229 | 179 191 | 158 null |
| | F002 | 189 202 | 240 240 | 210 null | 207 243 | 185 194 | 163 null |
| | F003 | 208 208 | 240 243 | 222 228 | 213 221 | 183 191 | 195 null |
| | F004 | 189 202 | 243 243 | 206 206 | 207 227 | 179 179 | 158 169 |
| | F005 | 189 206 | 243 249 | 202 null | 221 233 | 182 196 | 166 null |
| ♂ | M001 | 208 208 | 258 null | 220 240 | 217 227 | 179 191 | 153 null |
| | M002 | 189 210 | 245 null | 202 224 | 225 245 | 179 191 | 166 168 |
| | M003 | 206 208 | 237 243 | 206 null | 223 237 | 185 193 | 163 169 |
| | M004 | 202 206 | 243 null | 210 218 | 219 null | 185 191 | 179 187 |

表2. 飛磯地区におけるグリーンマーク個体の内訳と
放流効果の推定値

| | | G | | | |
|----|-------|----|------|------|-------|
| 地区 | | 非G | 放流種苗 | 由来不明 | 放流効果 |
| 飛磯 | 2006年 | 50 | 16 | 5 | 22.5% |
| | 2007年 | 58 | 16 | 5 | 20.3% |
| | 2008年 | — | — | — | — |
| | 2009年 | 91 | 0 | 0 | 0 |

非G: 非グリーンマーク個体、G: グリーンマーク個体

6月種苗

| | F001 | F002 | F003 | F004 | F005 |
|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| M001 | 2 | 27 | 3 | 6 | 1 |
| (期待値) | (3.6) | (3.6) | (3.6) | (3.6) | (3.6) |
| M002 | 1 | 0 | 0 | 2 | 1 |
| (期待値) | (3.6) | (3.6) | (3.6) | (3.6) | (3.6) |
| M003 | 6 | 0 | 2 | 1 | 2 |
| (期待値) | (3.6) | (3.6) | (3.6) | (3.6) | (3.6) |
| M004 | 3 | 0 | 1 | 0 | 6 |
| (期待値) | (2.0) | (2.0) | (2.0) | (2.0) | (2.0) |

9月種苗

| | F001 | F002 | F003 | F004 | F005 |
|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| M001 | 4 | 8 | 0 | 0 | 20 |
| (期待値) | (5.1) | (5.1) | (5.1) | (5.1) | (5.1) |
| M002 | × | × | × | × | × |
| (期待値) | × | × | × | × | × |
| M003 | 3 | 0 | 0 | 1 | 6 |
| (期待値) | (5.1) | (5.1) | (5.1) | (5.1) | (5.1) |
| M004 | 6 | 5 | 0 | 1 | 22 |
| (期待値) | (5.1) | (5.1) | (5.1) | (5.1) | (5.1) |

×: 交配なし

放流時

| | F001 | F002 | F003 | F004 | F005 |
|------|------|------|------|------|------|
| M001 | 6 | 35 | 3 | 6 | 21 |
| M002 | 1 | 0 | 0 | 2 | 1 |
| M003 | 9 | 0 | 2 | 2 | 8 |
| M004 | 9 | 5 | 1 | 1 | 28 |

放流前の人工種苗
における親の寄与

2006年放流採捕(飛磯)

| | F001 | F002 | F003 | F004 | F005 |
|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| M001 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| (期待値) | (0.7) | (4.0) | (0.3) | (0.7) | (2.4) |
| M002 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| (期待値) | (0.1) | (0.0) | (0.0) | (0.2) | (0.1) |
| M003 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| (期待値) | (1.0) | (0.0) | (0.2) | (0.2) | (0.9) |
| M004 | 0 | 1 | 4 | 6 | 4 |
| (期待値) | (1.0) | (0.6) | (0.1) | (0.1) | (3.2) |

放流後に採捕された人工種苗個体
における親の寄与

2007年放流採捕(飛磯)

| | F001 | F002 | F003 | F004 | F005 |
|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| M001 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| (期待値) | (0.7) | (4.0) | (0.3) | (0.7) | (2.4) |
| M002 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| (期待値) | (0.1) | (0.0) | (0.0) | (0.2) | (0.1) |
| M003 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| (期待値) | (1.0) | (0.0) | (0.2) | (0.2) | (0.9) |
| M004 | 0 | 3 | 9 | 3 | 1 |
| (期待値) | (1.0) | (0.6) | (0.1) | (0.1) | (3.2) |

2007年放流採捕(門之浜)

| | F001 | F002 | F003 | F004 | F005 |
|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| M001 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| (期待値) | (0.5) | (2.8) | (0.2) | (0.5) | (1.7) |
| M002 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| (期待値) | (0.1) | (0.0) | (0.0) | (0.2) | (0.1) |
| M003 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| (期待値) | (0.7) | (0.0) | (0.2) | (0.2) | (0.6) |
| M004 | 0 | 3 | 6 | 2 | 0 |
| (期待値) | (0.7) | (0.4) | (0.1) | (0.1) | (2.2) |

図5. 人工種苗の生産時および再捕時における親の寄与

論文審査結果要旨

エゾアワビは日本における栽培漁業の重要な対象種であり、昭和50年代後半から人工種苗生産技術が開発され、現在ではその方法論が確立されたといわれている種である。その技術を用いて、本種は東北地方や北海道地方をはじめ、日本全国で人工種苗が生産され、放流が行われてきている。また、放流された種苗の放流効果はこれまで人工種苗に特有な「グリーンマーク」と呼ばれる殻色マーカを用いて漁獲物中の人工種苗の割合や、放流した個体数に対する採捕された人工種苗の個体数で判定がなされている。しかし、毎年多くの地域で多数の親個体を用いて数回の生産を行うために、採捕された人工種苗の生産年や生産場所、両親の特定はできていない。また、世界的課題となっている人工種苗放流と遺伝的多様性の維持に関する情報も得られていない現状である。これらの問題を解決に導くにはまず正確な人工種苗放流個体の動態を把握するとともに、その遺伝的変異性や親個体のかかわりを明らかにする必要がある。

本研究は、エゾアワビの人工種苗放流に関する上述の問題に対して、マイクロサテライト DNA マーカーを活用して、これまでの人工種苗放流の効果測定に対する方法を検証し、その利点と弱点を整理して、最終的に人工種苗の両親の特定と、天然海域から採捕され個体の遺伝子型分析による放流個体を特定することによって、正確な放流効果を求める方法を開発することを目的としている。

本研究の成果として、まず解析に用いるマイクロサテライト DNA マーカーの特性を調べ、集団解析に活用できるマーカー座、親子判別分析に用いることができるマーカー座に分類している。その特性評価を行ったマーカー座を用いて、従来の「グリーンマーク」を用いた放流効果の推定法や、アليل頻度の変化量から求める放流効果の推定法との比較を行い、従来法の不確実性を実証したうえで、親子判別分析の必要性を明確にしている。また、人工種苗とその親の遺伝子型分析によって、確実に一対一の両親の判別ができることを実証したうえで、4年間で3回の採捕個体におけるか確実な人工種苗の特定を行って放流効果の実態を明らかにしている。さらに、放流個体の放流後の分散範囲がこれまで考えられていた範囲を大きく上回っていることを見出している。一方で、親子判別分析の結果から人工種苗の親個体を調べ、人工種苗生産時（放流前）においてもすべての親が均等に寄与しているのではなく、特定の親の個体が大きく寄与していることを明らかにするとともに、放流採捕された人工種苗個体の親の寄与を調べ、放流種苗時に多かった親の子供とは別の親の子供が多く採捕されていることを明らかにした。

これらのことにより、これまで考えられていたエゾアワビの人工種苗放流効果の精密な推定法を実証的に提案するとともに、この方法を利用して、より大規模な範囲で人工種苗生産や放流事業について実証試験を行うことによって、エゾアワビの放流効果を正確に測定できるとともに、天然集団に与える遺伝的多様性の変化をとらえることができることを提案している点で評価することができ、博士（農学）の学位の授与に値するものと判断した。